

EP 00/1906

REC'D	20 APR 2000
WIPO	PCT

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EPO - Munich  
31

11. April 2000

*A*

**Bescheinigung**

Herr Professor Dr. Werner L u b i t z in Wien/Österreich hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Bakterienghosts als Träger- und Targetingvehikel"

am 5. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol  
A 61 K 47/30 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 4. April 2000

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Joost

Aktenzeichen: 199 09 770.4

# **PATENTANWÄLTE**

European Patent Attorneys  
European Trade Mark Attorneys

DIPL.-ING. H. WEICKMANN  
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN  
DIPL.-CHEM. B. HUBER  
DR.-ING. H. LISKA  
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL  
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM  
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS  
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER  
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG  
DIPL.-PHYS. B. RUTTENSBERGER

POSTFACH 860 820  
81635 MÜNCHEN

KOPERNIKUSSTRASSE 9  
81679 MÜNCHEN

TELEFON (089) 4 55 63-0

TELEX 5 22 621

TELEFAX (089) 4 70 50 68

E-MAIL email@weickmann.de

Unser Zeichen:

18788P DE/WWvo

Anmelder:

Prof. Dr. Werner Lubitz  
Schönborngasse 12/7

1080 Wien  
Österreich

---

Bakterienhosts als Träger- und Targetingvehikel

---

## Bakterienghosts als Träger- und Targetingvehikel

### Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Bakterienghosts als Träger- und Targetingvehikel für eingekapselte Substanzen, z.B. Wirkstoffe.

10

15

20

Leere Bakterienhüllen, sogenannte Bakterienghosts, können durch kontrollierte, heterologe Expression eines Gens, das eine partielle Lyse der Zellmembran bewirkt, in gram-negativen Bakterien hergestellt werden (EP-A-O 291 021). Ein Beispiel für ein derartiges lytisches Gen ist das Gen E des Bakteriophagen PhiX174, das für ein Polypeptid kodiert, welches in den Zellwandkomplex gram-negativer Bakterien inseriert und durch die Oligomerisierung zur Ausbildung einer transmembranen Tunnelstruktur durch die innere und äußere Membran führt. Der innere Durchmesser dieser Tunnelstruktur kann je nach Lysebedingungen 40 bis 200 nm oder 500 bis 1000 nm betragen. Durch diesen Tunnel wird das cytoplasmatische Material der Zelle freigesetzt und eine leere Zellhülle mit intakter Morphologie zurückgelassen. Die Verwendung von Bakterienghosts als Totimpfstoffe oder Adjuvanzen sowie die Herstellung rekombinanter Bakterienghosts, die in ihrer Membran heterologe Oberflächenproteine tragen, wird in WO 91/13555 und WO 93/01791 beschrieben.

25

Weiterhin können Ghosts auch aus Gram-positiven Bakterien durch Verwendung eines chimären E-L-Lysegens hergestellt werden (US-A-5,075,223).

30

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß Bakterienghosts hervorragend als Träger oder Targetingvehikel für Wirkstoffe geeignet sind. Ein erster Vorteil der Bakterienghosts besteht darin, daß die Applikation ohne weiteres über den natürlichen Infektionsweg von Pathogenen wie etwa über den

- 2 -

Respirations- oder den Gastrointestinaltrakt möglich ist. Darüber hinaus bietet das Applikationssystem von Wirkstoffen über Ghosts als Träger aufgrund der Spezifität der Bakterienghosts für verschiedene Gewebearten ein wirkungsvolles Targeting. Damit wird der Wirkstoff an den gewünschten Zielort, z.B. den entsprechenden potenziellen Infektionsort der Ausgangsbakterien, mit hoher Effizienz gebracht. Dieser Vorteil von natürlichen Hüllen pathogener Bakterien als Vektoren kann bei anderen Applikationsformen, wie z.B. Liposomen, mit eingebauten äußeren Membranproteinen nur mühsam und unzulänglich erreicht werden.

Da Bakterienghosts herstellbar sind, die ausschließlich den gewünschten Wirkstoff enthalten, kann ein hoher Beladungsgrad und somit eine hohe Effizienz des Wirkstoffs erreicht werden. Zudem stellen Ghosts ein sicheres Trägermaterial dar, da es sich nicht um lebensfähige Organismen handelt. Schließlich handelt es sich bei Ghosts um Produkte mit einer hohen immunstimulatorischen Wirkung aufgrund des Vorhandenseins von Lipopolysacchariden und Peptidoglykanen, so daß keine zusätzlichen Adjuvanzien zugegeben werden müssen, da die Ghosts den Adjuvanzeffekt per se erfüllen.

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit die Verwendung von Bakterienghosts zur Verpackung von Wirkstoffen.

---

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Bakterienghosts als Träger- oder/und Targetingvehikel für einen Wirkstoff.

Der Wirkstoff kann jeder beliebige, in das Innere der Bakterienghosts transportierbare und dort vorzugsweise immobilisierbare Wirkstoff sein. Vorzugsweise wird der Wirkstoff ausgewählt aus pharmakologisch wirksamen Substanzen und Markierungssubstanzen. Beispiele für pharmakologisch wirksame Substanzen sind Polypeptide wie etwa Antikörper, therapeutisch wirksame Polypeptide wie Zytokine, Interferone,

- 3 -

Chemokine etc., Enzyme und immunogene Polypeptide oder Peptide. Ein weiteres Beispiel für Wirkstoffe sind Nukleinsäuren, insbesondere therapeutische Nukleinsäuren, z.B. Nukleinsäuren für die Gentherapie, die vorzugsweise in Form eines chromosomal integrierbaren Vektors vorliegen, oder Nukleinsäuren für eine Nukleinsäure-Vakzinierung, Antisense-Nukleinsäuren oder Ribozyme. Noch weitere Beispiele für Wirkstoffe sind niedermolekulare Wirksubstanzen, Peptide, Hormone, Antibiotika, Antitumormittel, Steroide, Immunmodulatoren etc. Die Wirkstoffe können in den Bakterienghosts in gelöster Form, als Suspensionen oder/und als Emulsionen gegebenenfalls in Kombination mit geeigneten Träger- oder/und Hilfsstoffen vorliegen. Weiterhin können die Wirkstoffe auch diagnostische Markierungssubstanzen, z.B. fluoreszierende Substanzen, Farbstoffe oder Röntgenkontrastmittel sein.

Auch nichtmedizinische Wirkstoffe können in Ghosts verpackt werden, z.B. Wirkstoffe aus dem Agrarbereich wie Insektizide, Herbizide, Mittel gegen Nematoden, Enzyme zur Bodenverbesserung, Dünger, Wachstumsförderer, wasserbindende Proteine zur besseren Durchfeuchtung oder Wasserbindung in der Atmosphäre. Andere Anwendungen sind die Verpackung von Farbstoffen für die Druckindustrie, z.B. fälschungssichere Tinten mit immunologischer Nachweismöglichkeit und die Verpackung von Vitaminen oder Probiotika für die Lebensmittelindustrie. Ebenso möglich ist die Verpackung von kosmetischen Mitteln oder von Stoffen wie Salzen oder ~~anderen ionischen Substanzen.~~

Vorzugsweise liegt der Wirkstoff in den Bakterienghosts in immobilisierter Form vor, d.h. daß der verpackte Wirkstoff unter physiologischen Bedingungen eine ausreichende Zeitdauer innerhalb der Bakterienghosts verbleibt, um einen Transport zur Zielzelle bzw. zum Zielgewebe zu ermöglichen. Die Immobilisierung des Wirkstoffs kann mittels kovalenter oder nichtkovalenter Wechselwirkungen, z.B. elektrostatischer Wechselwirkungen, hochaffiner biologischer Wechselwirkungen, durch

mechanische Retention oder eine Kombination von zwei oder mehreren der genannten Möglichkeiten erfolgen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Immobilisierung des Wirkstoffs über direkte oder indirekte Wechselwirkungen mit einem Rezeptor, der auf der Membrannenseite, z.B. der Innenseite der Zytoplasmamembran, der Ghosts, als integraler Membranbestandteil oder als nichtintegraler Membranbestandteil auf der Membran verankert lokalisiert ist. Der Rezeptor kann beispielsweise ein heterologes Polypeptid sein, das über einen oder mehrere Membrananker in die zytoplasmatische Membran der Ghosts integriert ist und durch heterologe Expression entsprechender Fusionsproteine, die mindestens eine Membranankerdomäne sowie mindestens eine Rezeptordomäne enthalten, in den Bakterienzellen vor der Lyse zu den Ghosts erzeugt wird. Bevorzugte Beispiele für Rezeptordomänen sind Avidin oder Streptavidin, die zur Ausbildung hochaffiner Bindungen mit Biotin oder Biotinanaloga in der Lage sind. Besonders bevorzugt ist Streptavidin. Die Verankerung von Streptavidin in Bakterienghosts erfolgt vorzugsweise durch rekombinante Expression eines Streptavidin-Fusionsproteins mit einem C-terminalen Membrananker in der zytoplasmatischen Membran von Bakterien vor der zur Bildung von Ghosts führenden Lyse. Darüber hinaus sind auch andere Rezeptordomänen geeignet, z.B. Antikörperbindungsstellen, Lectine etc., die mit einem Bindepartner eine hochaffine Bindung eingehen können.

Alternativ ist eine Verankerung des Rezeptors auch erst nach Lyse der Ghosts an der Membrannenseite möglich, beispielsweise durch Verwendung eines Rezeptors mit zwei Bindungsstellen, wobei eine Bindungsstelle in der Lage ist, an natürliche oder rekombinante Strukturen auf der Membrannenseite mit hoher Affinität zu binden, und die zweite Bindungsstelle für die direkte oder indirekte Immobilisierung von Wirkstoffen zur Verfügung steht.

Ein auf der Membraninnenseite der Ghosts lokalisiertes Rezeptormolekül kann eine direkte oder indirekte Immobilisierung von Wirkstoffen im Inneren der Ghosts bewirken. Bei einer direkten Immobilisierung wird ein Rezeptor gewählt, der mit dem in die Ghosts zu verpackenden Wirkstoff eine  
5 ausreichend starke Wechselwirkung eingehen kann, um eine weitgehende oder vollständige Retention des Wirkstoffs im Ghostinneren zu bewirken. Hierzu kann man beispielsweise mit Biotin, Haptenen oder/und Zuckern modifizierte Wirkstoffe einsetzen, die mit Rezeptoren wie Streptavidin, Antikörpern oder Lectinen eine stabile Bindung eingehen können.  
10 Vorzugsweise verwendet man einen modifizierten Wirkstoff, der eine oder mehrere Biotingruppen trägt und mit hoher Affinität an einen Streptavidin-Rezeptor binden kann.

Alternativ kann auch eine indirekte Immobilisierung des Wirkstoffs an den  
15 Rezeptor erfolgen, die z.B. über Wirkstoff-bindende Substanzen, die weiterhin mindestens eine zusätzliche Bindungsstelle für den Rezeptor besitzen, vermittelt wird. Beispiele für solche Wirkstoff-bindende Substanzen sind Polymere, z.B. Proteine wie Polylysin oder Polysaccharide wie etwa Protaminsulfat oder Dextran. Die Wirkstoff-bindenden Substanzen  
20 tragen weiterhin Rezeptorbindungsgruppen, z.B. Biotin oder Biotinanaloga, Haptene oder an Lectine bindefähige Zuckergruppen, die in der Lage sind, eine Verankerung an den auf der Membran lokalisierten Rezeptor zu bewirken.

---

25 Die Herstellung der erfindungsgemäßen mit Wirkstoffen beladenen Ghosts gemäß dem zuvor genannten Aspekt der Erfindung umfaßt zunächst die Herstellung der Bakterienghosts nach bekannten Methoden, z.B. durch Transformation der Bakterienzelle mit einem Lysegen, vorzugsweise dem Gen E des Phagen PhiX174 oder dem chimären E-L-Gen. Die Expression des  
30 Lysegens in der Bakterienzelle erfolgt vorzugsweise durch eine regulierbare Expressionskontrollsequenz, z.B. durch das Temperatur-regulierbare Promotor/Repressor-System  $\lambda$ -pR/cl857. Bei diesem Expressionskontroll-

system werden die transformierten Bakterien bei Temperaturen unterhalb 30°C kultiviert. Durch Temperaturerhöhung, vorzugsweise auf  $\geq 40^\circ\text{C}$  wird der thermosensitive  $\lambda\text{cl}857$  Repressor inaktiviert und das Lysegen exprimiert, was zur Ausbildung einer transmembranen Tunnelstruktur in der Zellhülle führt, wobei die Zellen innerhalb von wenigen Minuten lysiert werden. Durch mutierte  $\lambda$ -Promotor-/Operator-Systeme ist eine Anzucht der Bakterien auch bei höheren oder tieferen Temperaturen, z.B.  $37^\circ\text{C}$  möglich (WO98/07874). Die Bakterienghosts können dann durch Zentrifugation geerntet und nach Waschen und gegebenenfalls Gefriertrocknen zur Beladung mit Wirkstoffen eingesetzt werden. Hierzu werden die Ghosts mit einer den zu verpackenden Wirkstoff enthaltenden Lösung oder/und Suspension in Kontakt gebracht, unter Bedingungen, die das Eindringen ausreichender Wirkstoffmengen in die Bakterienghosts erlauben. Sofern erforderlich, werden darüber hinaus Rezeptorsubstanzen zugesetzt, die eine Immobilisierung der Wirkstoffmoleküle an der Membraninnenseite der Ghosts ermöglichen. Die Zugabe der Rezeptormoleküle kann vor, gleichzeitig oder nach dem Inkontaktbringen der Ghosts mit dem zu verpackenden Wirkstoff erfolgen.

Alternativ oder/und zusätzlich kann die Immobilisierung des Wirkstoffs über die Bildung einer Matrix im Ghostinneren erfolgen. Diese Matrix ist vorzugsweise eine Polymermatrix, die im Ghostinneren in situ entsteht und das Herausdiffundieren von Wirkstoffen aus den Ghosts verhindert. Die Polymermatrix kann durch Polymerisation oder/und Copolymerisation geeigneter Monomere oder/und durch Zusammenlagerung aggregierbarer Substanzen im Inneren der Bakterienghosts erzeugt werden. Die Polymerisation kann durch Einstellung entsprechender Bedingungen, z.B. durch Temperaturerhöhung, UV-Strahlung oder/und Zugabe geeigneter Initiatoren gestartet werden. Zweckmäßigerweise werden physiologisch verträgliche Monomere wie etwa Hydroxyfettsäuren, Aminosäuren, Saccharide oder Derivate davon verwendet, die zur Bildung eines im Körper unter physiologischen Bedingungen abbaubaren Polymeren führen.



- 7 -

Besonders bevorzugt wird die Matrix durch eine enzymkatalysierte Polymerbildung erzeugt. Hierzu werden geeignete Enzyme auf der Innenwand der Bakterienghosts immobilisiert, beispielsweise durch Integration in die Innenwand der zytoplasmatischen Membran (wie für Streptavidin beschrieben) oder indirekt, z.B. durch Bindung biotinylierter Enzyme an Streptavidinmoleküle auf der Ghostinnenmembran. Beispielsweise kann man zu diesem Zweck Enzyme verwenden, welche die Synthese von Polyhydroxyfettsäuren, z.B. Polyhydroxybuttersäure wie etwa die PHB-Synthase, Polysacchariden wie etwa Glucosyltransferasen oder Polypeptiden wie etwa nichtribosomale Polypeptid-synthetisierende Enzyme, die in der Peptidoglykansynthese vorkommen, katalysieren. Die durch Zugabe geeigneter Monomere und gegebenenfalls biochemischer Energieäquivalente wie etwa ATP in Gegenwart der Enzym erfolgende Wirkstoffe führt dazu, daß die sich im Ghostinneren befindenden Wirkstoffe in der durch die Enzyme gebildeten Matrix eingesponnen und somit im Ghostinneren gehalten werden.

Alternativ kann die Matrix auch durch Zusammenlagerung von aggregierbaren Substanzen, z.B. von Molekülen oder kolloidalen Partikeln erfolgen. Diese Zusammenlagerung kann durch Änderung der Umgebungsbedingungen, z.B. Temperaturänderung oder/und pH-Änderung initiiert werden.

---

~~Bei derjenigen Ausführungsform der Erfindung, in der die Wirkstoffe durch~~

Bindung einer Matrix im Ghostinneren immobilisiert werden, werden zunächst die zu verkapselnden Wirkstoffen in die Ghosts eingebracht und anschließend die Matrix gebildet.

Die erfindungsgemäßen Ghosts mit darin eingekapselten Wirkstoffen sind hervorragend als Träger- und Targetingvehikel geeignet, da die Ghosts schon aufgrund ihrer Natur als Bakterienhüllen bereits bevorzugt sich an bestimmte Zelltypen anlagern bzw. von Zellen des Immunsystems

aufgenommen werden. Verbessert werden kann dieses Targeting noch durch Verwendung von Ghosts mit modifizierten Hüllen, d.h. Ghosts, die targetspezifische, d.h. für Zielzellen oder Zielgewebe spezifische Oberflächenmoleküle an ihrer Membranaußenseite tragen. Die Einführung dieser targetspezifischen Moleküle wie etwa Zucker, z.B. Mannose oder Fucose, oder Invasin aus Yersinien oder Invasinderivaten, kann durch rekombinante Expression entsprechender Fusionspolypeptide in der Bakterienzelle vor der Lyse oder/und durch Anlagerung mittels eines geeigneten Rezeptorsystems (z.B. Streptavidin/Biotin) erfolgen.

Eine Ausführungsform der Erfindung ist der Einsatz der Wirkstoffe enthaltenden Ghosts für medizinische Zwecke. Die Verabreichung von Wirkstoffen, z.B. pharmakologischen Wirkstoffen, Antigenen, Antikörpern oder Nukleinsäuren, über Ghosts ist zur Prävention oder/und zur Bekämpfung aller Arten von Erkrankungen geeignet, z.B. zur Bekämpfung von durch Pathogene wie Viren, Bakterien, Parasiten oder Pilzen hervorgerufenen Erkrankungen, oder zur Prävention oder/und zur Bekämpfung von Tumor- oder Autoimmunerkrankungen oder zur Gentherapie. Als Wirkstoff wird dabei eine gegen die jeweilige Erkrankung wirksame Substanz verwendet, die nach Transport und gegebenenfalls Internalisierung in der Zielzelle ihre physiologische Wirkung hervorrufen. Die vorliegende Erfindung ermöglicht auch die Verabreichung von Wirkstoffkombinationen, d.h. die Ghosts können mehrere verschiedene Wirkstoffe enthalten oder es können Mischungen von Ghosts mit jeweils verschiedenen Wirkstoffen verwendet werden. Weiterhin kann die Verabreichung von Wirkstoffen über Ghosts auch für diagnostische Zwecke (Imaging) eingesetzt werden.

Eine besonders bevorzugte Anwendung ist der Einsatz von Bakterienghosts als Träger- und Targetingvehikel für die Gentherapie. Durch Verpackung von Nukleinsäuren wie DNA oder RNA in Ghosts kann die mangelnde Spezifität bestehender Nukleinsäure-Vehikel wie z.B. Liposomen entscheidend

verbessert werden. Der Vorteil von Bakterienghosts als Trägervehikel besteht weiterhin darin, daß sie eine hohe Kapazität für die Beladung mit Nukleinsäuren besitzen. Sie sind zudem als Vektoren ungefährlich, da sie keine lebenden Zellhüllen darstellen. Für gentherapeutische Anwendungen können die Nukleinsäuren in den Ghosts beispielsweise mit Polyhydroxyalkanoaten, z.B. Polyhydroxybuttersäure oder Copolymeren von Hydroxybuttersäure mit anderen Hydroxyfettsäuren wie etwa 3-Hydroxytridecansäure komplexiert werden. Dabei können die Nukleinsäuren in einer wachsenden Polymermatrix immobilisiert werden oder Komplexe aus Nukleinsäuren und amorphen Polyhydroxyfettsäuregranula hergestellt werden. Noch eine weitere Möglichkeit zur Verkapselung von Nukleinsäure in Bakterienghosts besteht darin, DNA-bindende Proteine wie etwa Polylysin oder Protamine, bei denen es sich um globuläre, stark alkalische Proteine mit relativ geringem Molekulargewicht zwischen 1000 und 5000 handelt, zu verwenden. Protamine können aus entfetteten Vogel- oder Fischspermien durch Schütteln mit verdünnten Säuren in Form von kristallinen Salzen, z.B. Protaminsulfate gewonnen werden. Protamine können in Ghosts in Form von Fusionsproteinen in die Membran eingelagert werden oder alternativ durch Biotinylierung an membrangebundenes Streptavidin in den Ghosts verankert werden.

Noch eine besonders bevorzugte Anwendung ist der Einsatz von Bakterienghosts zur Herstellung einer Nukleinsäure-Vakzine, insbesondere zur Herstellung einer DNA-Vakzine, und der Einsatz von Bakterienghosts als

Träger- oder/und Targetingvehikel für eine Nukleinsäure-Vakzine, insbesondere für eine DNA-Vakzine.

Bakterienghosts als Träger- oder Targetingvehikel zur Nukleinsäure-Vakzinierung führen zur Bildung einer wirkungsvollen und langandauernden spezifischen Immunantwort. Die die Nukleinsäuren enthaltenden Bakterienghosts werden von primären Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie etwa dendritischen Zellen und Makrophagen durch spezifische

- 10 -

Rezeptoren aufgenommen und in antigene Peptide fragmentiert. Zusätzlich wird mit hoher Effizienz das Antigen, welches durch die verpackte DNA-Sequenz kodiert wird, in den APC exprimiert. Dies hat zur Folge, daß das Antigen auf der Oberfläche der APC im Kontext mit MHC-I oder/und MHC-II-Strukturen den T-Lymphozyten präsentiert wird und eine Immunantwort induzieren kann. Untersuchungen ergaben in diesem Zusammenhang, daß Antigenprozessierungen und Präsentation durch MHC-I und II-Komplexe erfolgen, wobei eine humorale und zelluläre Immunantwort induziert wird, wie sie auch bei bakteriellen Infektionen mit Lebendkeimen beobachtet wird.

Die in die Bakterienghosts verpackte Nukleinsäure ist vorzugsweise in einer im Empfängerorganismus nicht replizierbaren Form. Sie enthält eine Sequenz, die für das in der Zielzelle zu exprimierende Antigen kodiert, in expressionsfähiger Form, d.h. in operativer Verknüpfung mit in der Zielzelle aktiven Expressionskontrollsequenzen wie etwa Promotoren und gegebenenfalls Enhancern, um eine hohe Genexpression zu erlauben, Polyadenylierungssequenzen, um eine korrekte Termination der transkribierten mRNA zu gewährleisten, oder/und Translationsinitiations-Sequenzen, um eine hohe Proteinproduktion zu ermöglichen. Weiterhin können die Nukleinsäuren einen bakteriellen Replikationsursprung, welcher die Amplifikation großer Nukleinsäuremengen in Bakterien wie etwa E.coli erlaubt, ein prokaryontisches Selektionsmarkergen, z.B. für eine Antibiotikaresistenz, ein Reportergen, das eine einfache Bestimmung der Expressionshöhe ermöglicht, z.B. das GFP-Gen oder/und immunmodulatorische Sequenzen enthalten.

Vorzugsweise ist die Nukleinsäure eine DNA, besonders bevorzugt eine Plasmid-DNA, die in zirkulärer oder/und in linearer Form vorliegen kann. Es ist jedoch auch die Verwendung von RNA-Vakzinen oder Vakzinen auf Basis von Nukleinsäureanaloga, die transkribierbar sind, aber eine erhöhte physiologische Stabilität aufweisen, denkbar.

Der die Expression der Antigen-kodierenden Sequenz antreibende Promotor ist vorzugsweise ein starker viraler Promotor/Enhancer, z.B. der Rous Sarcoma Virus (RSV)-Promotor/Enhancer, der Murine Leukemia Virus (MLV)-Promotor/Enhancer, der SV40-Promotor/Enhancer und besonders bevorzugt der Cytomegalovirus (CMV)-Promotor/Enhancer. Als Transkriptions-terminatoren können die Polyadenylierungssequenzen aus SV40 oder aus dem Rinderwachstumshormongen, vorzugsweise jedoch aus dem Kaninchen- $\beta$ -Globin-Gen verwendet werden.

Als Antigen wird dabei ein mit der jeweiligen Erkrankung assoziiertes Polypeptid oder ein Peptidfragment davon verwendet, das nach Expression in der Zielzelle eine Immunantwort induziert. Die vorliegende Erfindung ermöglicht auch die Verabreichung von Kombinationsvakzinen, d.h. die Ghosts können mehrere verschiedene Antigen-kodierende Nukleinsäuren enthalten, die z.B. vom selben Erreger oder von unterschiedlichen Erregern stammen können, oder es können Mischungen von Ghosts mit jeweils verschiedenen Antigen-kodierenden Nukleinsäuren verwendet werden.

In einer Ausführungsform der Erfindung können sogenannte homologe Kombinationen von Bakterienghost und Antigen-kodierender Nukleinsäure verwendet werden, wobei z.B. der Bakterienghost Oberflächenstrukturen trägt, die aus der gleichen Spezies oder dem gleichen Organismus stammen wie das von der Nukleinsäure-Vakzine kodierte Antigen. Gegebenenfalls kann der Ghost auf seiner Oberfläche sogar eine dem kodierte Antigen

---

entsprechende Oberflächenstruktur tragen. Diese homologe Ghost/Nukleinsäure-Kombination kommt insbesondere zur Vakzinierung gegen bakterielle Infektionen in Frage, sie kann jedoch - bei Verwendung von rekombinanten Ghosts mit entsprechenden Oberflächenstrukturen - auch auf die Vakzinierung gegen andere Erkrankungen, z.B. virale Erkrankungen, erweitert werden.

- 12 -

Alternativ dazu wird eine heterologe Ghost/Nukleinsäure-Kombination verwendet. Bei einer derartigen heterologen Kombination erfüllt der Bakterienghost im allgemeinen Adjuvansfunktionen. Es sind jedoch auch Ausführungsformen möglich, bei denen ein aus einem pathogenen Bakterium stammender Ghost in Kombination mit einer heterologen Nukleinsäure als Kombinationsvakzine gegen zwei unterschiedliche Erreger verwendet wird.

Schließlich sind die Bakterienghosts auch als Träger- oder Targetingvehikel für den Agrarbereich geeignet, wo sie zum Ausbringen von Wirkstoffen wie etwa Herbiziden, Fungiziden oder/und Insektiziden verwendet werden können.

Besonders bevorzugt stammen die Ghosts von gram-negativen Bakterien, die z.B. ausgewählt werden aus Escherichia coli, Klebsiella, Salmonella, Enterobacter, Pseudomonas, Vibrio, Actinobacillus, Haemophilus, Pasteurella, Bordetella, Helicobacter, Francisella, Brucella, Erwinia, Pantoea, Streptomyces, Frankia, Serratia, Agrobacterium, Azotobacter, Bradyrhizobium, Burkholderia, Rhizobium, Rhizomonas und Sphingomonas. Besonders bevorzugte Beispiele für gram-positive Bakterien sind Staphylococcus, Streptococcus und Bacillus.

Die pharmazeutische Verabreichung der Wirkstoff-enthaltenden Ghosts kann nach geläufigen Methoden erfolgen, beispielsweise oral, aeregen, z.B. intranasal, intraokulär, topisch oder parenteral, z.B. intramuskulär, intraperitoneal, intravenös oder subkutan.

Die Verabreichung der Ghosts erfolgt vorzugsweise auf demselben Weg, wie auch eine natürliche Infektion des Organismus mit dem Erreger erfolgt. So können Bakterienghosts mit Wirkstoffen, die zur Bekämpfung von pathogenen Erregern vorgesehen sind, deren Hautpenetrationspforte der Gastrointestinaltrakt ist (E.coli, Salmonella, Vibrio oder Helicobacter), oral

verabreicht werden. Ghosts aus Erregern von Lungenentzündungen, die entsprechende Wirkstoffe enthalten, z.B. Actinobacillus, Pasteurella, Pseudomonas oder Haemophilus, werden vorzugsweise aerogen verabreicht.

- 5 Die erfindungsgemäße Verabreichung von Bakterienghosts mit Wirkstoffen ist nicht nur für die Humanmedizin, sondern auch für die Tiermedizin, insbesondere für die protektive Impfung von Haustieren, wie etwa Schweinen, Kühen etc. geeignet.

- 10 Für landwirtschaftliche Anwendungsformen können die Ghosts über den Boden, die Luft oder als Kapseln an Samen verabreicht werden.

- Die Applikation von Wirkstoffen über Bakterienghosts hat gegenüber bisherigen Applikationsformen eine Vielzahl von Vorteilen. So reichen  
15 bereits geringe Wirkstoffmengen zur Erzielung einer starken Wirkung aus. Weiterhin ist eine Zielzellen/Gewebe-spezifische Verabreichung der Wirkstoffe möglich. Aufgrund der bereits für sich immunogen wirkenden Bakterienghosthüllen wird eine Adjuvanswirkung erzielt. Der in den Ghost eingeschlossene Wirkstoff ist vor Abbau durch physiologische Prozesse,  
20 z.B. durch Enzyme wie Proteasen, Nukleasen oder Hydrolasen geschützt. Darüber hinaus ist eine Kombination mit weiteren Wirkstoffen möglich. Schließlich können die Bakterienghosts kostengünstig hergestellt und die Wirkstoffe einfach und kostengünstig formuliert werden.

- 
- 25 Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Bakterienghosts mit einem darin verkapselten Wirkstoff, wobei es sich bei dem Wirkstoff beispielsweise um eine Nukleinsäure handeln kann.

- Schließlich betrifft die Erfindung auch eine pharmazeutische oder  
30 landwirtschaftliche Zusammensetzung, umfassend einen Bakterienghost mit einem darin verpackten Wirkstoff. Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann in Form üblicher pharmazeutischer Präparate

- 14 -

vorliegen, z.B. als injizierbare oder aerogen applizierbare Lösung oder Suspension, als orales Präparat, z.B. als Tablette, Kapsel oder Dragee, als Creme oder Salbe etc. Weiterhin kann die Zusammensetzung als rekonstituierbares Lyophilisat vorliegen.

5

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung ist verhältlich durch ein Verfahren umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen von Bakterienghosts und
- (b) Inkontaktbringen der Bakterienghosts mit einem Wirkstoff unter Bedingungen, die zu einer Verpackung und vorzugsweise zu einer Immobilisierung des Wirkstoffs in den Ghosts führen.

10

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Abbildungen und Beispiele erläutert. Es zeigen:

15

Figur 1 eine schematische Darstellung des Streptavidin-Verankerungsplasmids pAV1, das ein Fusionsgen E-FX $\alpha$ -StrpA unter Kontrolle des induzierbaren lac-Promotors (lacPO), den Replikationsursprung ColE1 und das Ampicillinresistenzgen bla enthält.

20

Figur 2 die Reaktionskinetik von in Streptavidin-Ghosts gebundener Alkalischer Phosphatase.

25

## Beispiele

### 1. Material und Methoden

#### 1.1 Herstellung von Streptavidin-kodierenden Plasmiden

30

Das Plasmid pBGG9 (British Biotechnology Limited) wurde mit den Restriktionsenzymen NdeI und HindIII geschnitten. Ein das vollständige Streptavidinogen (Argarana et al., Nucleic Acids Res. 14 (1986), 1871-1882)



enthaltendes 495 bp DNA-Fragment wurde durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Elektroelution isoliert. Die NdeI-Restriktionsstelle wurde mit Klenow Polymerase aufgefüllt, und das Fragment wurde zwischen die HincII- und HindIII Restriktionsstellen von M13K11RX (Waye et al., Nucleic Acids Res. 13 (1985), 8561-8571) inseriert. Das resultierende Phageimid M13FN enthält 160 Kodons des Streptavidins fusioniert an das 3'-Ende einer kurzen Sequenz, welche für die Erkennungssequenz Ile-Glu-Gly-Arg des Proteasefaktors Xa (FXa) kodiert. Diese FXa-StrpA Kasette wurde durch Restriktionsspaltung mit BamHI isoliert, und das resultierende 509 bp lange DNA-Fragment wurde in das mit BamHI linearisierten Plasmid pSK- (Stratagene, Cleveland, Ohio) subkloniert, um das Plasmid pFN6 zu erzeugen. Dasselbe 509 bp lange BamHI-Fragment wurde in den mit BamHI gespaltenen Membrantargetingvektor pKSEL5 inseriert, wobei das Plasmid pAV11 mit dem Streptavidin fusioniert an die 5'-terminale Membranankersequenz E' erhalten wurde (Fig. 1).

### 1.2 Herstellung von Streptavidinhosts

E.coli NM522-Zellen (Stratagene) wurden simultan mit dem Lyseplasmid pML1 (Szostak et al., J. Biotechnol. 44 (1996), 161-170) und dem Streptavidin-kodierenden Plasmid pAV1 transformiert. Die Transformanten wurden in LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) mit

Ampicillin (200 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) bei 28°C kultiviert. 1 l Medium wurde mit einer Übernachtskultur inokuliert, die aus einer einzelnen Transformantenkolonie stammte, und als Vorkultur für einen Fermenter (Typ MRD 60TE, Meredos GmbH, Bovenden, Deutschland) verwendet. Die Bakterien wurden im Fermenter in einem Volumen von 10 l unter Belüftung und Rühren bis zum Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,4 kultiviert. Dann wurde IPTG auf eine Endkonzentration von 3 mM zur Induktion der Expression von Streptavidin zugegeben. Nach 30 min wurden

0,2 M  $\text{MgSO}_4$  zugegeben und 20 min danach wurde die Expression des Lyseproteins E durch Temperaturerhöhung von 28°C auf 42°C induziert. Nach 1 h wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 g geerntet. Die Resuspension der Pellets in destilliertem Wasser (Endvolumen 5 l) führte zu einer sofortigen Lyse. Die Ghosts wurden zweimal in einem großen Volumen von Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen und anschließend lyophilisiert.

### 1.3 Licht- und Elektronenmikroskopie

Lichtmikroskopische Untersuchungen wurden mit einem Olympus AX70 True Research System Microscope durchgeführt. Transmissions-Elektronenmikrographien wurden mit einem Siemens Elmiscop 101-Elektronenmikroskop aufgenommen. Raster-Elektronenmikrographien wurden mit einem Hitachi S-800 Feldemissions-Raster-Elektronenmikroskop aufgenommen. Die Fixierung von Zellen und die Vorbereitung für die Elektronenmikroskopie erfolgte wie bei Witter et al. (J. Bacteriol. 172 (1990), 4109-4114) beschrieben.

Zum Nachweis von Streptavidin wurden die Ghosts mit goldmarkiertem Albumin-Biotin (10 nm, Sigma Immunochemicals) verdünnt in Tris-Puffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl pH 7,4) unter Schütteln bei 37°C für 20 min inkubiert, gewaschen und für die Elektronenmikroskopie fixiert.

---

### 1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot

Ghosts oder Proteinproben wurden in einem Gelbeladepuffer (2% SDS, 5 % 2-Mercaptoethanol, 10% Glycerin und 0,003 % Bromphenolblau in 0,063 M Tris-HCl Puffer pH 6,8) für 5 min aufgekocht und auf 10 % SDS Polyacrylamidgel nach der Methode von Laemmli (Nature 227 (1970), 680 bis 685) aufgetrennt. Westernblots wurden wie von Towbin et al. (Biotechnology 24 (1992), 145-149) beschrieben durchgeführt. Die Blots

wurden in TBS mit 1% Rinderserum blockiert und mit Anti-Streptavidin-Antiserum aus Kaninchen (Sigma Immunochemicals) inkubiert.

### 1.5 Bindung von biotinylierter Alkalischer Phosphatase und Fluoreszenz-markiertem Biotin

Biotinylierte Alkalische Phosphatase (Pierce) wurde 1:1000 in Tris-Puffer verdünnt. 2 mg lyophilisierte Ghosts wurden in 500  $\mu$ l verdünnter Lösung von Alkalischer Phosphatase suspendiert und unter Schütteln bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Proben wurden bei 10 000 g zentrifugiert und dreimal in 20 ml Trispuffer und ein viertes Mal in Diethanolaminpuffer (10 mM Diethanolamin, 0,5 mM  $MgCl_2$  pH 9,5) gewaschen und anschließend in 6 Aliquots unterteilt. Dann wurde Substrat (2,5 mM p-Nitrophenylphosphat in Diethanolaminpuffer) zugegeben und die Reaktionen nach 0,5, 1, 2, 4, 8 oder 16 min durch Zugabe eines gleichen Volumens an 7 M NaOH gestoppt. Die Proben wurden bei 10 000 g zentrifugiert und die Überstände bei 410 nm vermessen.

Es wurde ein molarer Adsorptionskoeffizient  $\epsilon = 18,5 \times 10^3 \text{ x M}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$  bestimmt und zur Berechnung der gebildeten Menge an p-Nitrophenol nach der Lambert-Beer Gleichung verwendet. Die Anzahl der pro Ghost gebundenen Moleküle Alkalischer Phosphatase wurde unter der Annahme berechnet, daß eine Aktivitätseinheit der Alkalischen Phosphatase der Freisetzung von 1  $\mu$ mol Nitrophenol pro min bei pH 9,5 und 37°C entspricht. Eine Einheit Alkalische Phosphatase entspricht 0,7  $\mu$ g; das Molekulargewicht ist 140 000 und 1 mg Ghost enthalten  $6,7 \times 10^8$  einzelne Hüllen.

Zur Bindung von Fluoreszenz-markiertem Biotin (FITC-Biotin) wurden die Ghosts wiederholt in PBS gewaschen, bis die relative Fluoreszenzintensität im Überstand geringer als 0,5 bei 530 nm (Anregung bei 490 nm) war. 1 mg lyophilisierte Ghosts wurden in 2 ml einer Lösung mit 0,4056  $\mu$ g FITC-

Biotin/100 ml TBS unter Schütteln für 30 min inkubiert. Die Proben wurden bei 10 000 g zentrifugiert und die Fluoreszenzintensität in den Überständen gemessen.

5 1.6: Biotinylierung von Polylysin

Poly-L-Lysin-Hydrobromid, Molekulargewicht 18 000 (Sigma) wurde unter Verwendung des folgenden Protokolls biotinyliert: 6 mg Polylysin wurden in 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) aufgenommen. 50  $\mu$ l einer  
10 Lösung von 640  $\mu$ g Biotin-N-Hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim) in 200  $\mu$ l DMSO wurden zugegeben und der pH-Wert unter Verwendung von 0,5 M NaOH auf 10 eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend für 48 h gegen Wasser  
dialysiert. Ein HABA-Test (Sigma) ergab ein Bindeverhältnis von 2 mol  
15 Biotin pro mol Polylysin.

1.7: Fluoreszenzmarkierung von DNA

20 Ein beliebiges ausgewähltes Plasmid (pUC18) wurde zur Erzeugung von fluoreszenzmarkierter DNA verwendet. Die Markierung erfolgte unter Verwendung der Polymerase Kettenreaktion und markierter Nukleotide (Cy3-dCTP, Pierce). Die Reaktionsansätze enthielten 200  $\mu$ M dATP, 200  $\mu$ M  
25 dGTP, 200  $\mu$ M dTTP, 200  $\mu$ M dCTP (davon 75% Cy3-dCTP), jeweils 1  $\mu$ M Oligonukleotidprimer, 0,2 ng/ $\mu$ l linearisierte Plasmid DNA und 0,02 U/ $\mu$ l Taq DNA-Polymerase in Polymerasepuffer. Das Reaktionsprotokoll war wie folgt: Vordenaturierung 4 min bei 95°C; 35 Cyclen: 1 min 95°C/1 min 60°C/3  
min 72°C; 5 min Schlußextension bei 72°C. Die Proben wurden  
30 phenolisiert, mit Ethanol präzipitiert, in 10 mM Tris HCl pH 8,0 resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

### 1.8 Bindung von fluoreszenzmarkiertem Dextran und DNA/Polylysin

1 mg lyophilisierte Streptavidin-Ghosts wurden in 1 ml Tris Puffer suspendiert. 50  $\mu$ l einer wässrigen Lösung (1 mg/ml) von biotinyliertem Fluoreszenz-markiertem Dextran (Molecular Probes Europe BV) wurden zugegeben und die Mischung unter Schütteln bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Ghosts wurden dreimal in 1,5 ml Tris-Puffer gewaschen und durch Lichtmikroskopie analysiert. Zur Bildung von Komplexen aus fluoreszenzmarkierter DNA und biotinyliertem Polylysin wurden verdünnte Lösungen von DNA (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l in HBS [150 mM NaCl, 20 mM HEPES pH 7,3-]) und Poly-L-Lysin (1  $\mu$ g/ $\mu$ l in HBS) hergestellt. Die Lösungen wurden in einem Gewichtsverhältnis DNA/Polylysin von 10:1 vereinigt und schnell vermischt. Dann wurden Streptavidin-Ghosts darin suspendiert, unter Schütteln bei 37°C für 1 h inkubiert, gewaschen und lichtmikroskopisch analysiert.

## **2. Ergebnisse**

### 2.1 Membranverankerung von Streptavidin

Bei Verwendung von Bakterienghosts als Vehikel zum Transport von Wirkstoffen sollte der Wirkstoff innerhalb der Bakterienhülle fixiert werden.

Rekombinante Ghosts, die Streptavidin verankert in ihrer Hülle enthalten, sind in der Lage biotinylierte Verbindungen mit hoher Affinität zu binden. Hierzu wurde - wie unter 1.1 beschrieben - das Plasmid pAV1 hergestellt, welches ein Hybridgen enthält, das aus den 54 5'-terminalen Kodons des Gens E des Bakteriophagen PhiX174 (E') gefolgt von einer in frame-Fusion der FXa-StrpA-Kassette besteht. Dieses Plasmid ist schematisch in Fig. 1 dargestellt.

## 2.2 Herstellung von Streptavidin-Ghosts

Es stehen mehrere E-spezifische Lyseplasmide mit verschiedenen Gen E  
Expressionskontrollsequenzen, Replikationsursprüngen und Selektions-  
markergenen zur Verfügung (Szostak et al., J. Biotechnol. 44 (1996), 161-  
170). Das hier verwendete Plasmid pML1 enthält das Gen E unter  
transkriptioneller Kontrolle des  $\lambda p_R$ -cl857 Systems. Der Beginn der Lyse  
kann im E.coli Stamm NM522/pML1 durch Abnahme der optischen Dichte  
bei 600 nm etwa 10 min nach Erhöhung der Kultivierungstemperatur von  
28°C auf 42°C beobachtet werden.

Zur Herstellung von Ghosts durch ein alternatives E-Lyseprotokoll wurden  
0,2 M  $MgSO_4$  zum Kulturmedium 20 min vor der Induktion der Gen E  
Expression gegeben. Bei dieser Prozedur wird das Protein E in den  
bakteriellen Zellwallkomplex eingebaut, aber die Zell-Lyse wird durch die  
hohe Salzkonzentration im umgebenden Medium gehemmt. In mit  $MgSO_4$   
behandelten Kulturen wird die Expression des Gens E für 1 h durchgeführt  
und die Zellen werden anschließend durch Zentrifugation geerntet. Eine  
Resuspension dieser Zellen in Wasser oder Puffer mit geringer Ionenstärke  
führt zu einer sofortigen, explosiven Lyse, die erheblich größere Lyselöcher  
als die normale E Lyse erzeugt.

## 2.3 Mikroskopische Darstellung von durch alternative Lyse erzeugten Ghosts

Ghosts sind von lebenden Zellen durch lichtmikroskopische Untersuchungen  
unterscheidbar, bei denen sie deutlich transparenter als intakte Bakterien  
erscheinen. Lichtmikroskopische Untersuchungen an Ghosts, die durch  
alternative E-Lyse erzeugt worden waren, zeigten Zellen mit abgesprengten  
Polkappen oder Rissen in der Mitte, die sie in zwei Hälften öffnen. Die Ghosts  
erschiene(n) etwas verlängert.

#### 2.4 Nachweis von Streptavidin mit Gold-konjugiertem Biotin

Zum Nachweis der Lokalisierung von Streptavidin in den Ghosts, wurden Streptavidin-Ghosts mit goldmarkierten Albumin-Biotinpartikeln inkubiert, gewaschen und elektronenmikroskopisch untersucht. Ultradünnschnitte zeigten Goldpartikel, die ausschließlich entlang der Ghost-Innenmembran angeordnet waren.

#### 2.5 Bestimmung der Streptavidinverankerung in Ghosts

Zur Bestimmung ihres Streptavidingehalts wurden Streptavidin-Ghosts zusammen mit definierten Mengen an reinem Streptavidin als Kontrolle durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert. Die Gele wurden auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit Anti-Streptavidin-Antiserum behandelt. Eine densitometrische Analyse der Streptavidin-spezifischen Banden auf Westernblots zeigte einen Streptavidingehalt von etwa 5% des gesamten Zellgewichts.

#### 2.6 Funktionelle Bindung von biotinylierter alkalischer Phosphatase und FITC Biotin und Quantifizierung der Bindestellen

Zur Bestimmung der Biotinbindekapazität von Streptavidin-Ghosts wurde ein enzymatischer Test entwickelt. Streptavidin-Ghosts und Streptavidin-negative Ghosts (~~Ghosts ohne auf ihrer Membran verankertes Streptavidin~~), die beide durch das alternative Lyseprotokoll hergestellt worden waren, und Streptavidin-Ghosts, die durch Standardlyse hergestellt worden waren, wurden mit biotinylierter Alkalischer Phosphatase inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde die Menge an zurückgehaltenem Enzym unter Verwendung von p-Nitrophenylnitrophosphat als Substrat bestimmt. Während in Streptavidin-negativen Ghostproben praktisch keine Reaktion sichtbar war, zeigten alternativ lysierte Streptavidinghosts eine hellgelbe

Färbung. Die Reaktion wurde nach kontrollierten Intervallen gestoppt und die Absorption der Probenüberstände bei 410 nm gemessen.

Nach der unter 1.5 angegebenen Berechnungsmethode wurde die Anzahl der pro Ghost gebundenen Moleküle Alkalischer Phosphatase mit etwa 200 bestimmt. Interessanterweise waren die durch normale Lyse erzeugten Streptavidin-Ghosts negativ im enzymatischen Test. Folglich ist bei großen Wirkstoffmolekülen wie der Alkalischen Phosphatase das Vorhandensein von durch das alternative Lyseprotokoll erzeugten größeren Löchern in der Zellmembran erforderlich, um eine effiziente Diffusion in das Innere des Ghosts zu ermöglichen.

Fig. 2 zeigt die Kinetik der Reaktion von biotinylierter Alkalischer Phosphatase, die an durch alternative Lyse erzeugten Streptavidin-Ghosts gebunden wurde. Als Kontrolle wurden Streptavidin negative Ghosts erzeugt durch alternative Lyse verwendet.

Ein entsprechender Test wurde unter Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Biotin durchgeführt. Ghost- und Streptavidin-Ghost-Proben wurden mit FITC-Biotin inkubiert, zentrifugiert und die restliche Fluoreszenz von ungebundener Markierung in den Überständen gemessen. Diese viel kleineren Moleküle (Molekulargewicht 832) wurden in einer Anzahl von  $2060 \pm 400$  pro Ghost gebunden.

## 2.7 Bindung von fluoreszenzmarkiertem biotinyliertem Dextran und fluoreszenzmarkierter DNA

Fluoreszenzmarkiertes biotinyliertes Dextran und fluoreszenzmarkierte DNA wurden als Modell verwendet, um die Fixierung von Verbindungen zu zeigen, die zum Targeting von Wirkstoffen in Streptavidin-Ghosts verwendet werden können. Hierzu wurden Streptavidin-Ghosts mit einer Mischung von biotinyliertem Poly-L-Lysin und fluoreszenzmarkierter DNA bzw. mit



- 23 -

fluoreszenzmarkiertem biotinyliertem Dextran inkubiert und durch Fluoreszenzlichtmikroskopie analysiert. In beiden Fällen konnte die Fluoreszenzmarkierung auf den Ghosts nachgewiesen werden. Negative Kontrollen (Ghosts ohne Streptavidin) wurden nicht angefärbt.

### Ansprüche

1. Verwendung von Bakterienghosts zur Verpackung von Wirkstoffen.
2. Verwendung von Bakterienghosts als Träger- oder/und Targetingvehikel für einen Wirkstoff.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Wirkstoff ausgewählt ist aus pharmakologisch wirksamen Substanzen, Markierungssubstanzen, landwirtschaftlich wirksamen Substanzen und Farbstoffen.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Wirkstoff in den Bakterienghosts in immobilisierter Form vorliegt.
5. Verwendung nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Immobilisierung über Wechselwirkungen mit einem Rezeptor erfolgt, der auf der Membraninnenseite der Ghosts lokalisiert ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß der Rezeptor ein heterologes Polypeptid ist, das in die zytoplasmatische Membran der Ghosts integriert ist.

- 25 -

7. Verwendung nach Anspruch 5 oder 6,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß das heterologe Polypeptid ein Streptavidin oder Avidin  
enthaltendes Fusionspolypeptid ist.
- 5
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß eine direkte Immobilisierung des Wirkstoffs an den Rezeptor  
erfolgt.
- 10
9. Verwendung nach Anspruch 8,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man einen mit Rezeptorbindungsgruppen derivatisierten Wirkstoff  
verwendet.
- 15
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 7,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß eine indirekte Immobilisierung des Wirkstoffs an den Rezeptor  
erfolgt.
- 20
11. Verwendung nach Anspruch 10,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die indirekte Immobilisierung des Wirkstoffs an den Rezeptor  
~~über Wirkstoff-bindende Substanzen erfolgt, die weiterhin mindestens~~  
eine zusätzliche Bindungsstelle für den Rezeptor besitzen.
- 25
12. Verwendung nach Anspruch 11,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Wirkstoff-bindenden Substanzen ausgewählt werden aus  
Polylysin, Dextran und Protaminsulfat.
- 30

- 26 -

13. Verwendung nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Immobilisierung über die Bildung einer Matrix im  
Ghostinneren erfolgt.

5

14. ~~Verfahren nach Anspruch 13,~~  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Matrix durch Polymerisation oder/und Copolymerisation von  
Monomeren im Ghostinneren entsteht.

10

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Polymerisation durch Temperaturerhöhung, durch UV-  
Strahlung oder/und Zugabe von Initiatoren gestartet wird.

15

16. ~~Verwendung nach Anspruch 13 oder 14,~~  
~~dadurch gekennzeichnet,~~  
~~daß eine enzymkatalysierte Polymerisation erfolgt.~~

20

17. Verwendung nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß Enzyme eingesetzt werden, die die Synthese von  
Polyhydroxyfettsäuren, Polysacchariden oder Polypeptiden  
katalysieren
- 

25

18. ~~Verwendung nach Anspruch 13,~~  
~~dadurch gekennzeichnet,~~  
~~daß die Matrix durch Zusammenlagerung von aggregierbaren~~  
Substanzen gebildet wird.

30

- 27 -

19. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Ghosts heterologe, für Zielzellen oder Zielgewebe spezifische  
Oberflächenmoleküle enthalten.

5

20. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche im  
medizinischen Bereich.

21. Verwendung nach Anspruch 20 zur Prävention oder/und zur  
Bekämpfung von durch Pathogene hervorgerufenen Erkrankungen,  
von Tumorerkrankungen oder von Autoimmunerkrankungen.

10

22. Verwendung nach Anspruch 20 oder 21 zur Gentherapie.

15

23. Verwendung nach Anspruch 20 oder 21 zur Nukleinsäure-  
Vakzinierung.

24. Verwendung nach Anspruch 20 für diagnostische Zwecke.

20

25. Verwendung nach einem der Ansprüche 20 bis 24,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Verabreichung der Ghosts auf demselben Weg wie die  
natürliche Infektion des Organismus mit dem Erreger erfolgt.

25

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 19 im Agrarbereich.

27. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß die Ghosts mehrere verschiedene Wirkstoffe enthalten.

30

28. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß Mischungen von Ghosts mit jeweils verschiedenen Wirkstoffen  
eingesetzt werden.

5

29. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die Ghosts von gram-negativen oder/und gram-positiven  
Bakterien stammen.

10

30. Verwendung von Bakterienghosts zur Herstellung einer Nukleinsäure-  
Vakzine.

31. Verwendung von Bakterienghosts als Träger- oder/und  
Targetingvehikel für eine Nukleinsäure-Vakzine.

15

32. Verwendung nach Anspruch 30 oder 31,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß die in den Ghosts verpackte Nukleinsäure eine für das zu  
exprimierende Antigen kodierende Sequenz in operativer Verknüpfung  
mit Expressionskontrollsequenzen enthält.

20

33. Verwendung nach Anspruch 32,  
dadurch gekennzeichnet,

25

daß die Nukleinsäure weiterhin einen bakteriellen  
Replikationsursprung, ein prokaryontisches Selektionsmarkergen, ein  
Reportergen oder/und immunmodulatorische Sequenzen enthält.

34. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 33,  
dadurch gekennzeichnet,

30

daß die Ghosts mehrere verschiedene Antigen-kodierende  
Nukleinsäuren enthalten.

- 29 -

35. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 34,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man eine homologe Kombination von Bakterienghosts und  
Antigen-kodierenden Nukleinsäuren verwendet.
- 5
36. Verwendung nach einem der Ansprüche 30 bis 34,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man eine heterologe Kombination von Bakterienghosts und  
Antigen-kodierenden Nukleinsäuren verwendet.
- 10
37. Bakterienghost mit einem darin verkapselten Wirkstoff.
38. Bakterienghost nach Anspruch 37,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß der Wirkstoff eine Nukleinsäure ist.
- 15
39. Pharmazeutische oder landwirtschaftliche Zusammensetzung,  
umfassend einen Bakterienghost mit einem darin verpackten  
Wirkstoff.
- 20
40. Verfahren zur Herstellung eines Bakterienghosts nach Anspruch 37  
oder 38 oder einer Zusammensetzung nach Anspruch 39, umfassend  
die Schritte
- 
- (a) ~~Bereitstellen von Bakterienghosts und~~
- 25 (b) Inkontaktbringen der Bakterienghosts mit einem Wirkstoff  
unter Bedingungen, die zu einer Verpackung des Wirkstoffs in  
den Ghosts führen.

- 30 -

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Bakterienghosts als Träger- und  
5 Targetingvehikel für Wirkstoffe.

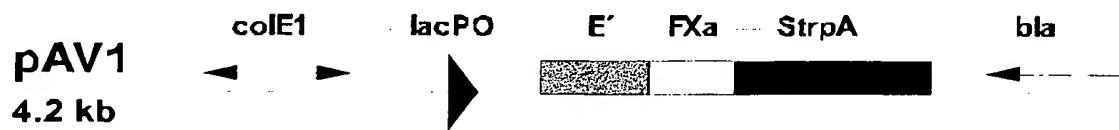
10 vo 4. März 1999

---

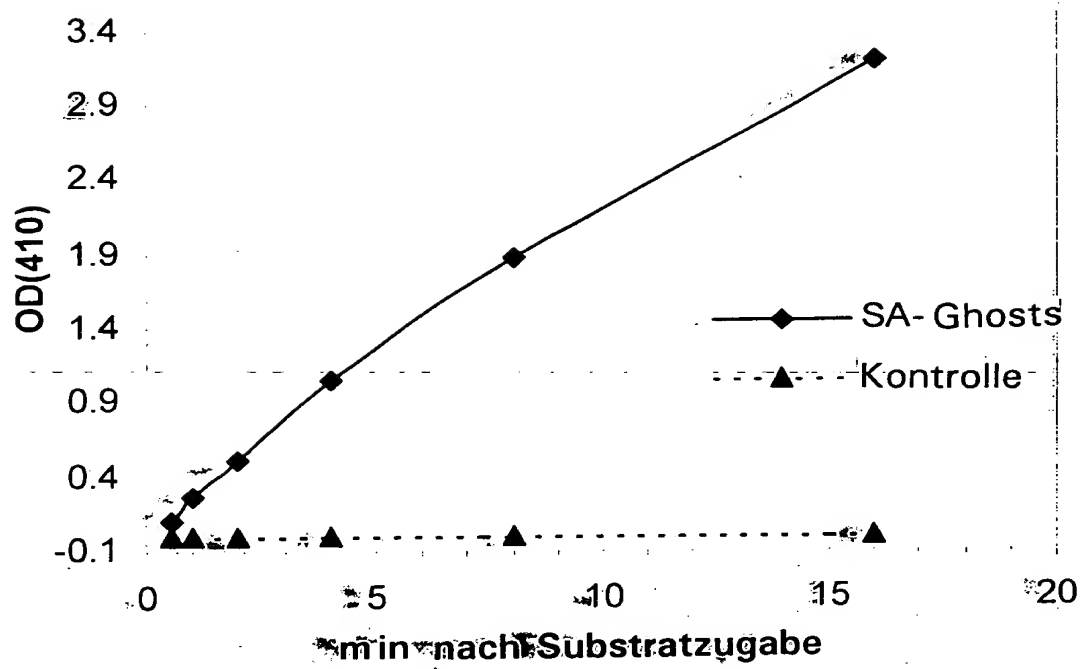


Fig. 1.

- 5. März 1999



Figur 2



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**